



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/39, 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/44633 (43) Date de publication internationale: 10 septembre 1999 (10.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00453 (22) Date de dépôt international: 1er mars 1999 (01.03.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/02800 3 mars 1998 (03.03.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-Christophe, Francis [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). MINKE, Jules, Maarten [NL/FR]; 23, avenue Molière, F-69960 Corbas (FR). (74) Mandataire: MONCHENY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des</i> <i>revendications, sera republiée si des modifications sont</i> <i>reçues.</i>	
(54) Titre: LIVE RECOMBINED VACCINES INJECTED WITH ADJUVANT (54) Titre: VACCINS VIVANTS RECOMBINES ET ADJUVES (57) Abstract <p>The invention concerns a recombinant live vaccine comprising a viral vector incorporating and expressing in vivo a heterologous nucleotide sequence, preferably a pathogenic agent gene, and at least a adjuvant compound selected among the acrylic or methacrylic polymers and the maleic anhydride and alkenyl derivative copolymers. It concerns in particular an acrylic and methacrylic acid polymer cross-linked with a sugar or polyalcohol polyalkenyl ether (carbomer), in particular crosslinked with a saccharose allyl or with allylpentaerythritol. It can also be a maleic anhydride and crosslinked ethylene copolymer, for example divinylether.</p> (57) Abrégé <p>Le vaccin vivant recombinant comprend un vecteur viral incorporant et exprimant in vivo une séquence nucléotidique hétérologue, de préférence un gène d'un agent pathogène, et au moins un composé adjuvant choisi parmi les polymères acrylique ou méthacrylique et les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle. Il s'agit notamment d'un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique réticulé par un éther polyalcénylique de sucre ou de polyalcool (carbomère), en particulier réticulé par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol. Il peut aussi s'agir d'un copolymère d'anhydride maléique et d'éthylène réticulé, par exemple par du divinyléther.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

"Vaccins vivants recombinés et adjuvés".

La présente invention concerne un perfectionnement aux vaccins vivants recombinants intégrant et exprimant in vivo un ou plusieurs gènes hétérologues. Elle a trait en particulier à de tels vaccins adjuvés, à l'utilisation de composés adjuvants particuliers pour la mise en oeuvre de tels vaccins ainsi qu'aux méthodes de vaccination y relatives. Elle a encore pour objet un procédé de préparation de ces vaccins.

Il est classique d'incorporer aux vaccins inactivés ou de sous-unités des adjuvants destinés à accroître la réponse immunitaire vis-à-vis des antigènes que comprennent ces vaccins.

On a aussi pensé incorporer des adjuvants aux vaccins vivants atténués lorsque l'atténuation de microorganismes a conduit à une diminution de la réponse immunitaire.

Récemment il a aussi été proposé des vaccinations combinées contre plusieurs pathogènes à l'aide d'un vaccin inactivé pour une valence et d'un vaccin vivant atténué pour l'autre valence. On a ainsi proposé de reprendre le vaccin vivant atténué, conservé sous forme lyophilisée, dans la composition de vaccin inactivé adjuvé. Celle-ci joue le rôle de véhicule de reprise pour le vaccin vivant, sans qu'aucun effet adjuvant ne soit recherché pour ce dernier.

EP-A-532 833 propose un vaccin contre la rhinopneumonie du cheval, pathologie provoquée par l'herpèsvirus équin (EHV). Le vaccin est un vaccin inactivé et adjuvé, regroupant virus EHV-1 et virus EHV-4 inactivés, adjuvés par l'adjuvant Havlogen®, à base de polymère polyacrylique.

Comme pour la plupart des herpèsvirus, il n'existe actuellement aucun vaccin efficace permettant l'élimination rapide du virus après l'infection. Les vaccins connus tentent de protéger contre l'apparition des signes cliniques. En général, l'effet sur l'excrétion virale reste limité.

Selon EP-A-532 833, le vaccin développé conduirait à une chute de l'excrétion virale allant de 79 à 93 % (voir partie résultats). Huit animaux témoins sur neuf ont excrété du virus après épreuve sur une moyenne de 1,4 jours alors que la durée d'excrétion normale après épreuve est habituellement supérieure ou égale à 5 jours. Cela traduit une épreuve de faible intensité qui majore artificiellement la protection des chevaux vaccinés par rapport aux témoins. La baisse de l'excrétion virale n'est donc

pas significative dans cette expérience.

Des adjuvants de type carbomère (carbomer) ont aussi été utilisés dans des vaccins influenza équins (IEV) à virus inactivé.

Mumford et al. (Epidemiol. Infect. (1994), 112, 421-437) rappellent qu'il faut deux doses de vaccin IEV équin pour induire chez le cheval une réponse humorale transitoire et une faible protection contre le virus. Les auteurs comparent les effets adjuvants du carbomère et du phosphate d'aluminium sur des vaccins inactivés en présence ou non d'anatoxine tétanique. Dans tous les cas, un faible titre en anticorps mesuré par la technique SRH (single radial haemolysis) vis-à-vis des souches H7N7 et H3N8 est obtenu après une première vaccination et il faut attendre une deuxième, puis une troisième vaccination pour voir apparaître des réponses transitoires plus fortes.

US-A-4 500 513 présente aussi des essais de vaccination contre le virus influenza équin avec un vaccin inactivé en présence d'un carbomère. L'origine des animaux et leur statut médical n'est pas indiqué avec précision et il semble qu'il s'agisse d'animaux du terrain (colonne 11, 2ème paragraphe). Les titres élevés en anticorps, mesurés par une technique d'inhibition de l'hémagglutination, indiquent que les animaux avaient probablement déjà été infectés par influenza et que la réponse induite après vaccination était de type rappel, et non pas de primo-vaccination.

Enfin, Fort Dodge Solvay commercialise des vaccins influenza équin inactivé (Duvaxyn® IE et IE-T plus) et un vaccin rhinopneumonie équine inactivé (Duvaxyn® EHV_{1,4}), en adjuvant carbomère.

On connaît aussi des vaccins inactivés commerciaux contre l'influenza équin, adjuvés par l'hydroxyde d'alumine (par exemple Tetagripiffa®, Merial, Lyon, France).

Un grand nombre d'autres adjuvants sont utilisés dans le cadre des vaccins classiques inactivés ou de sous-unités. On peut citer par exemple hydroxyde d'alumine, phosphate d'alumine, Avridine®, DDA, monophosphoryl lipid A, Pluronic L121 et autres polymères-blocs, muramyl peptides, saponines, trehalose dimycolate, copolymères d'anhydride maléique et d'éthylène, copolymères de styrène et d'acide acrylique ou méthacrylique, polyphosphazène, émulsions huileuses, etc.

WO-A-94 16681 suggère d'adjuver un vaccin vivant recombinant exprimant un

gène hétérologue d'un virus enveloppé par une composition vaccinale sous forme d'émulsion eau-dans-l'huile, huile-dans-l'eau ou eau-dans-l'huile-dans l'eau.

Une telle solution peut cependant présenter un certain nombre d'inconvénients.

5 En pratique, l'utilisateur final doit disposer d'une part de principe actif lyophilisé et d'autre part d'une émulsion déjà constituée, qui doit permettre de reprendre le principe actif lyophilisé.

Un manque de stabilité de l'émulsion au cours du stockage pourrait être préjudiciable à l'efficacité et à l'innocuité du vaccin reconstitué.

10 L'activité des microorganismes vivants atténués peut être remise en cause à la suite de leur instabilité dans la phase huileuse. Cela peut notamment être le cas pour les virus qui peuvent alors perdre leur viabilité.

Les vaccins en émulsion peuvent aussi poser des problèmes d'innocuité au site d'injection.

15 La présente invention s'est donc donnée pour objectif de proposer de nouvelles compositions vaccinales à base de vaccin vivant recombinant exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment gène hétérologue, comportant un adjuvant qui soit capable d'accroître de façon remarquable l'immunité conférée par rapport au même vaccin non adjuvé et qui soit parfaitement adapté à ce type de vaccin.

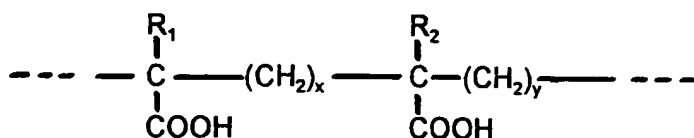
20 La déposante a trouvé que les composés de la classe des carbomères étaient en mesure d'adjuver dans les conditions requises ce type de vaccin et cela dans des proportions inattendues. Des essais menés sur les herpèsvirus animaux (EHV-1, Equine Herpes Virus) ont montré que l'apport du carbomère permettait de diminuer l'excrétion virale lors d'une infection expérimentale, dans des proportions inattendues. D'autres essais menés sur le virus Influenza A équin ont permis d'obtenir de manière
25 surprenante, chez le cheval, des titres sérologiques précoces et très élevés, supérieurs à ceux obtenus avec les meilleurs vaccins commerciaux.

La présente invention a donc pour objet un vaccin vivant recombinant comprenant un vecteur viral incorporant et exprimant in vivo une séquence nucléotidique hétérologue, de préférence un gène d'un agent pathogène, et au moins
30 un composé adjuvant choisi parmi les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique et les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle.

Les composés préférés sont les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique réticulés, notamment par des éthers polyalcényliques de sucres ou de polyalcools. Ces composés sont connus sous le terme carbomère (Pharmeuropa vol. 8, n° 2, juin 1996). L'homme de l'art peut aussi se référer à US-A-2 909 462 (incorporé par référence) décrivant de tels polymères acryliques réticulés par un composé polyhydroxylé ayant au moins 3 groupes hydroxyle, de préférence pas plus de 8, les atomes d'hydrogène d'au moins trois hydroxyles étant remplacés par des radicaux aliphatiques insaturés ayant au moins 2 atomes de carbone. Les radicaux préférés sont ceux contenant de 2 à 4 atomes de carbone, e.g. vinyles, allyles et autres groupes éthyléniquement insaturés. Les radicaux insaturés peuvent eux-mêmes contenir d'autres substituants, tel que méthyl. Les produits vendus sous la dénomination Carbopol® (BF Goodrich, Ohio, USA) sont particulièrement appropriés. Ils sont réticulés par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol. Parmi eux, on peut citer les Carbopol® 974P, 934P et 971P.

Parmi les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, on préfère les EMA® (Monsanto) qui sont des copolymères d'anhydride maléique et d'éthylène, linéaires ou réticulés, par exemple réticulés par du divinyléther. On peut se référer à J. Fields et al., Nature, 186 : 778-780, 4 juin 1960, incorporé par référence.

Sur le plan de leur structure, les polymères d'acide acrylique ou méthacrylique et les EMA® sont formés de préférence de motifs de base de formule suivante :



dans laquelle :

- R_1 et R_2 , identiques ou différents, représentent H ou CH_3
- $x = 0$ ou 1 , de préférence $x = 1$
- $y = 1$ ou 2 , avec $x + y = 2$

Pour les EMA®, $x = 0$ et $y = 2$. Pour les carbomères, $x = y = 1$.

La dissolution de ces polymères dans l'eau conduit à une solution acide qui sera neutralisée, de préférence jusqu'à pH physiologique, pour donner la solution adjuvante

dans laquelle le vaccin proprement dit sera incorporé. Les groupes carboxyliques du polymère sont alors en partie sous forme COO^- .

De manière préférée, on réalise une solution d'adjuvant selon l'invention, notamment de carbomère, dans de l'eau distillée, de préférence en présence de chlorure de sodium, la solution obtenue étant à pH acide. On dilue cette solution mère en l'ajoutant dans la quantité nécessaire (pour l'obtention de la concentration finale souhaitée), ou une partie importante de celle-ci, d'eau chargée en NaCl, de préférence eau physiologique (NaCl 9 g/l), en une ou plusieurs fois avec neutralisation concomitante ou subséquente (pH 7,3 à 7,4), de préférence par NaOH. Cette solution à pH physiologique sera utilisée telle quelle pour reprendre le vaccin, notamment conservé sous forme lyophilisée.

La concentration en polymère dans la composition vaccinale finale sera de 0,01 % à 2 % P/V, plus particulièrement de 0,06 à 1 % P/V, de préférence de 0,1 à 0,6 % P/V.

L'invention se révèle particulièrement utile pour la vaccination contre les herpèsvirus animaux. L'invention vise tout particulièrement les herpèsvirus équin (EHV-1 et EHV-4 notamment), félin (FHV), canin (CHV), aviaire (Marek et ILTV), bovin (BHV), porcin (PRV = virus de la maladie d'Aujeszky ou virus de la pseudo-rage).

L'invention a donc pour objet des vaccins vivants recombinants comprenant au moins un vecteur viral incorporant et exprimant au moins un gène d'un tel herpèsvirus, et au moins un adjuvant conforme à l'invention.

A titre d'exemple, l'homme de l'art peut se reporter à WO-A-92 15672 (incorporé par référence), qui décrit la réalisation de vecteurs d'expression à base de poxvirus capables d'exprimer de tels gènes. On y trouvera par exemple un canarypox exprimant les gènes gB, gC et gD de EHV-1 (vCP132), ce qui est applicable aussi à EHV-4, un virus de la vaccine exprimant ces mêmes gènes (vP 1043), un virus de la vaccine exprimant les gènes gI(gB), gIII(gC), gIV(gD) de BHV-1, un canarypox exprimant gD de FHV-1, ou encore des recombinants exprimant les gènes gII (gB), gIII (gC), gp50 (gD) de PRV. Il peut aussi se reporter à WO-A-95/26 751 (incorporé par référence), qui décrit des virus recombinants vCP320, vCP322 et vCP294 exprimant les gènes gB, gC, gD, respectivement, de CHV. Il peut aussi se reporter aux recombinants exprimant des

gènes de FHV, PRV, BHV dans FR-A-2 647 808 ou WO90/12882 (incorporés par référence).

5 L'invention se révèle aussi particulièrement intéressante pour la vaccination contre les virus Influenza, comme on le démontre ici pour EIV (virus influenza équin ou virus de la grippe équine). On peut aussi citer la grippe aviaire (AIV), la grippe porcine (Swine influenza virus).

A titre d'exemple, l'homme de l'art peut se reporter au canarypox recombinant exprimant le gène HA d'EIV dans WO-A-92 15 672.

10 L'invention a donc pour objet des vaccins vivants recombinants comprenant au moins un vecteur viral incorporant et exprimant au moins un gène d'un tel virus influenza, et au moins un adjuvant conforme à l'invention. Notamment, le vaccin comprend un mélange de deux ou trois vecteurs incorporant et exprimant chacun un gène HA, les gènes provenant de souches différentes, par exemple des souches influenza équin (grippe équine) Prague, Kentucky et Newmarket. Dans le même ordre
15 d'idée, un seul vecteur peut être utilisé pour incorporer et exprimer les HA de 2 ou des 3 souches.

L'invention s'applique aussi à d'autres pathogènes animaux, tels que notamment FeLV (voir aussi recombinants canarypox dans WO-A-92 15672 à titre d'exemple, exprimant env, gag = vCP93 et vCP97), le tétanos (voir aussi WO-A-92 15 672 et les
20 recombinants vCP161 et vP1075, canarypox et vaccine, exprimant la toxine tétanique), virus de la maladie de Carré (canine distemper virus ou CDV) (voir recombinant vCP 258 dans WO-A-95 27780, incorporé par référence).

L'invention a donc pour objet des vaccins vivants recombinants comprenant au moins un vecteur viral incorporant et exprimant au moins un gène d'un tel virus.

25 L'invention a aussi pour objet des vaccins recombinants multi-valents, c'est-à-dire contenant deux ou plusieurs vecteurs recombinants exprimant des antigènes de deux ou plusieurs maladies, en mélange dans une solution adjuvante conforme à l'invention.

30 Au demeurant, l'invention s'applique à l'utilisation de tout type de vecteur viral d'expression, tel que poxvirus (virus de la vaccine, y compris NYVAC selon WO-A-92/15672, fowlpox, canarypox, pigeonpox, swinepox, etc.), adénovirus, herpèsvirus. Le

canarypox, e.g. ALVAC (WO-A-95/27780 et WO-A-92/15672), se révèle particulièrement approprié dans le cadre de la présente invention.

Dans le vaccin prêt-à-l'emploi, notamment reconstitué, le vecteur viral est présent dans les quantités habituellement utilisées et décrites dans la littérature.

5 Les vaccins vivants recombinants se présentent en général sous une forme lyophilisée permettant leur conservation et sont repris extemporanément dans un solvant ou excipient, qui sera ici la solution d'adjuvant conforme à l'invention.

10 L'invention a donc aussi pour objet un ensemble de vaccination comprenant, conditionnés séparément, du vaccin lyophilisé et une solution du composé adjuvant selon l'invention pour la reprise du vaccin lyophilisé.

15 L'invention a aussi pour objet une méthode de vaccination consistant à administrer par voie parentérale, de préférence sous-cutanée, intramusculaire, intradermique, ou par voie mucosale, un vaccin conforme à l'invention, à raison d'une ou plusieurs administrations, éventuellement avec une étape préalable de reprise du vaccin lyophilisé (le vecteur recombinant) dans une solution de composé adjuvant.

Un objectif d'une telle méthode peut être de protéger les animaux sur le plan clinique et de diminuer l'excrétion virale, ce qui correspond surtout au cas des herpèsvirus.

20 Un autre objectif peut être d'accroître la réponse immunitaire et de la rendre plus précoce, notamment par induction d'anticorps dès la première administration.

L'invention a encore pour objet l'utilisation des composés adjuvants conformes à l'invention pour la réalisation de vaccins vivants recombinants, notamment conférant une réponse immunitaire améliorée et plus précoce et/ou une baisse accrue de l'excrétion virale. On se référera à ce qui a été dit plus haut.

25 L'invention va être maintenant décrite plus en détails, à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs et se référant au dessin dans lequel:

- la figure 1 représente la séquence nucléotidique du gène EIV HA de la souche EIV Newmarket 2/93 ;
- la figure 2 représente la séquence nucléotidique du gène FHV-1 gC ;
- 30 - la figure 3 représente un graphe montrant l'évolution de l'excrétion virale après infection expérimentale chez des chevaux vaccinés à l'aide de différents vaccins contre

l'herpèsvirus équin

EXEMPLES

Exemple 1 : Génération des plasmides donneurs pour les sites d'insertion 5 C3, C5 et C6 dans le virus canarypox "ALVAC"

Les plasmides donneurs pour les différents sites d'insertion dans le virus canarypox "ALVAC" (Tartaglia *et al.* Virology. 1992. **188**. 217-232 incorporé par référence), sont décrits dans la demande WO-A-95/27780, exemple 20.

Ces plasmides ont été désignés dans cette demande de la façon suivante :

10 "plasmide VQH6CP3LSA.2" pour le site "C3"

"plasmide HC5LSP28" pour le site "C5"

"plasmide pC6L" pour le site "C6".

Exemple 2 : Génération du virus recombiné vCP258 (ALVAC/CDV HA+F)

15 La souche Onderstepoort du virus CDV a été utilisée pour isoler les gènes HA et F. (Séquence du gène HA décrite par Curran *et al.* Virology. 1991. **72**. 443-447, et séquence du gène F décrite par Barrett *et al.* Virus Research. 1987. **8**. 373-386, incorporés par référence).

20 La construction du plasmide donneur pMM103 pour l'insertion des cassettes d'expression promoteur vaccine H6- gène CDV F et promoteur vaccine H6-gène CDV HA dans le locus C6 du virus ALVAC est décrite dans l'exemple 19 de la demande WO-A-95/27780.

25 Ce plasmide a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison *in vitro* (Piccini *et al.* Methods in Enzymology. 1987. **153**. 545-563, incorporé par référence) avec le virus ALVAC pour générer le virus recombiné désigné vCP258 comme à l'exemple 19 de la susdite demande.

Exemple 3 : Génération du virus recombiné vCP1502 (ALVAC/EIV HA Prague)

30 La séquence du gène HA (souche EIV Prague) est présentée à la figure N° 23

de la demande WO-A-92/15672. L'ARN viral du génome du virus de la grippe équine souche Prague 56 a été extrait à partir de 100 µl d'une suspension virale de ce virus avec le kit d'extraction "Total RNA Separator kit" de CLONTECH (Palo Alto, CA)(Cat#K1042-1). Le culot d'ARN a été repris dans 10 µl d'eau ultrapure et une
5 réaction de synthèse d'ADN complémentaire, suivie d'une amplification PCR (= réaction "RT-PCR") a été réalisée en prenant comme matrice 2 µl d'ARN viral purifié et les oligonucléotides suivants :

TAY51A (SEQ ID N°1) (70 mer)

5'CGCGGCCATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAACACTCAAATTCT
10 AATATTAGCCACTTCGG 3'

et TAY53A (SEQ ID N°2) (36 mer)

5' CGCGCGGCGGTACCTTATATACAAATAGTGCACCGC 3'

pour amplifier le gène EIV HA Prague. Le fragment PCR ainsi obtenu a été ligaturé dans le vecteur pCRII (InVitrogen, San Diego, CA) pour donner le plasmide pJT007.

15 Le plasmide pJT007 a été digéré par NruI et Asp718 pour isoler un fragment NruI-718 d'environ 1800 pb contenant la fin du promoteur H5 et le gène HA Prague 56 dans sa totalité. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide donneur C5 HC5LSP28, préalablement digéré par NruI et Asp718, pour donner finalement le plasmide pJT008. Ce plasmide contient la cassette d'expression H6-gène HA Prague 56 dans le locus C5
20 du virus ALVAC. La structure de ce plasmide a été vérifiée par séquençage et carte de restriction complète.

Ce plasmide est le plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression H6-gène HA Prague 56 dans le locus C5.

Après linéarisation par NotI, le plasmide pJT008 a été utilisé comme plasmide
25 donneur pour la recombinaison *in vitro* (Piccini *et al.* Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563) avec le virus ALVAC pour générer le virus recombiné désigné **vCP1502**.

Exemple 4 : Génération du virus recombiné vCP1529 (ALVAC/EIV HA Kentucky 1/94)

30 L'ARN viral du génome du virus de la grippe équine souche Kentucky 1/94 (Daly *et al.* J. Gen. Virol. 1996. 77. 661-671, incorporé par référence) a été extrait à partir de

100 µl d'une suspension virale de ce virus avec le kit d'extraction "Total RNA Separator kit" de CLONTECH (Palo Alto, CA)(Cat#K1042-1). Le culot d'ARN a été repris dans 10 µl d'eau ultrapure et une réaction RT-PCR a été réalisée en prenant comme matrice 2 µl d'ARN viral purifié et les oligonucléotides suivants :

5 TAY55A (SEQ ID N°3) (70 mer)

5'CGCGGCCATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAAGACAACCATTAT
TTTGATACTACTGACCC 3'

et TAY57A (SEQ ID N°4) (42 mer)

5' CGCGCGGCGGTACCTCAAATGCAAATGTTGCATCTGATGTTG 3'

10 pour amplifier le gène HA. Le fragment PCR ainsi obtenu a été ligaturé dans le vecteur pCRII (InVitrogen, San Diego, CA) pour donner le plasmide pJT001. La séquence du gène EIV HA souche Kentucky 1/94 cloné dans le plasmide pJT001 n'est pas différente de la séquence du gène EIV HA souche Kentucky 1/94 disponible dans la base de données GenBank (Numéro d'accèsion L39914, incorporé par référence).

15 Le plasmide pJT001 contenant le gène HA (Kentucky 1/94) a été digéré par NruI et Asp718 pour isoler un fragment NruI-Asp718 de 1800 pb (contenant la fin du promoteur H6 et le gène HA Kentucky 1/94 dans sa totalité). Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide donneur C5 HC5LSP28, préalablement digéré par NruI et Asp718, pour donner finalement le plasmide pJT005. Ce plasmide contient la cassette
20 d'expression H6-gène HA Kentucky 1/94 dans le locus C5 du virus ALVAC. La structure de ce plasmide a été vérifiée par séquençage et carte de restriction complète.

Ce plasmide est le plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression H6-gène HA Kentucky 1/94 dans le locus C5.

Après linéarisation par NotI, le plasmide pJT005 a été utilisé comme plasmide
25 donneur pour la recombinaison *in vitro* (Piccini *et al.* Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563) avec le virus ALVAC pour générer le virus recombiné désigné **vCP1529**.

Exemple 5 : Génération du virus recombiné vCP1533 (ALVAC/EIV HA Newmarket 2/93)

30 L'ARN viral du génome du virus de la grippe équine souche Newmarket 2/93 (Daly *et al.* J. Gen. Virol. 1996. 77. 661-671). a été extrait à partir de 100 µl d'une

suspension virale de ce virus avec le kit d'extraction "Total RNA Separator kit" de CLONTECH (Cat#K1042-)). Le culot d'ARN a été repris dans 10 µl d'eau ultrapure et une réaction RT-PCR a été réalisée en prenant comme matrice 2 µl d'ARN viral purifié et les oligonucléotides suivants :

5 CCL007 (SEQ ID N°5) (40 mer)

5' TTGTCGACTCAATCATGAAGACAACCATTATTTTGATACT 3'

et CCL0018 (SEQ ID N°6) (34 mer)

5' TTGGATCCTTACTCAAATGCAAATGTTGCAYCTG 3'

pour amplifier le gène HA. Le fragment PCR ainsi obtenu a été ligaturé dans le vecteur pCRII (InVitrogen, San Diego, CA) pour donner le plasmide pCCL026. La séquence du gène HA (souche EIV Newmarket 2/93) est présentée dans la figure N°1 (SEQ ID N°7).

Le plasmide pCCL026 contenant le gène HA (souche Newmarket 2/93) a été digéré par SpeI et Accl. Les oligonucléotides suivants :

TAY99N (SEQ ID N°8) (74 mer)

15 5'CTAGTTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAAGACAACCATTATTTTG
ATACTACTGACCCATTGGGT 3'

et TAY100N (SEQ ID N°9) (72 mer)

5'AGACCCAATGGGTGAGTAGTATCAAAATAATGGTTGTCTTCATTACGATACAAA
CTTAACGGATATCGCGAA 3'

20 ont été appariés et ligaturés avec le plasmide pCCL026 digéré par SpeI+Accl pour donner le plasmide pJT003. L'oligonucléotide double brin TAY99N/TAY100N contient la région 3' du promoteur H6 jusqu'au site NruI et les 40 premières bases codantes du gène HA.

25 Le plasmide JT003 a été digéré par NruI et XhoI pour isoler un fragment NruI-XhoI d'environ 1800 pb contenant la fin du promoteur H6 et le gène HA dans sa totalité. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide donneur C5 HC5LSP28, préalablement digéré par NruI et XhoI, pour donner finalement le plasmide pJT004. Ce plasmide contient la cassette d'expression H6-gène HA Newmarket 2/93 dans le locus C5 du virus ALVAC. La structure de ce plasmide a été vérifiée par séquençage et carte de restriction complète.

30 Ce plasmide est le plasmide donneur pour l'insertion de la cassette d'expression

H6-gène HA Newmarket 2/93 dans le locus C5.

Après linéarisation par PvuI, le plasmide pJT004 a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison *in vitro* (Piccini *et al.* Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563) avec le virus ALVAC pour générer le virus recombiné désigné **vCP1533**.

5

Exemple 6 : Génération du virus recombiné vCP132 (ALVAC/EHV-1 gB+gC+gD)

La construction du virus recombiné est décrite dans les exemples 25 et 26 de la demande WO-A-92/15672. Ce virus a été généré par recombinaison *in vitro* entre le virus ALVAC et le plasmide donneur pJCA049. Ce plasmide contient les 3 cassettes d'expression suivantes clonées dans le site d'insertion C3 :

10

promoteur vaccine I3L-gène EHV-1 gB

promoteur vaccine H6-gène EHV-1 gC

promoteur entomopox 42K-gène EHV-1 gD

15

Les séquences des gènes EHV-1 gB, gC et gD sont décrites dans la demande WO-A-92/15672 aux figures N° 2 (séquence du gène EHV-1 gp13 = gC), N°6 (séquence du gène EHV-1 gp14 = gB) et N°12 (séquence des gènes EHV-1 gD, gp63 et gE).

20

Exemple 7 : Génération du virus recombiné vCP243 (ALVAC/FHV-1 gB+gC+gD)

La séquence du gène FHV-1 gB (souche CO) est présentée à la figure N°34 de la demande WO-A-90/12882.

25

Le gène FHV-1 gC (souche CO)(séquence présentée à la figure N°2) (SEQ ID N°10) a été cloné à partir du fragment EcoRI F (7,6 kpb). Il a une taille de 1599 pb et code pour une protéine de 533 acides aminés.

Le gène FHV-1 gD (souche CO)(séquence présentée à la figure N°28 de la demande WO-A-92/15672) a été cloné à partir du fragment EcoRI M (4,4 kpb) (plasmide pFHV_{EcoRI}M).

30

Construction de la cassette d'expression I3L-gène FHV-1 gB muté au niveau des signaux d'arrêt précoce de transcription (TTTTTNT).

Les oligonucléotides suivants :

MP287 (SEQ ID N°11) (20 mer)

5' GATTAAACCTAAATAATTGT 3'

et JCA158 (SEQ ID N°12) (21 mer)

5 5' TTTTCTAGACTGCAGCCCGGACATCATGCAGTGGTTAAAC 3'

ont été utilisés pour une amplification PCR avec la matrice d'un plasmide contenant le promoteur vaccine I3L (Rivière *et al.* J. Virol. 1992. 66. 3424-3434, incorporé par référence) pour générer un fragment XbaI-bout franc de 120 pb (contenant le promoteur vaccine I3L) = fragment A. Les oligonucléotides suivants :

10 JCA213 (SEQ ID N°13) (18 mer)

5' GGGTTTCAGAGGCAGTTC 3'

et JCA238 (SEQ ID N°14) (21 mer)

5' ATGTCCACTCGTGGCGATCTT 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pJCA001 un
15 fragment bout franc-BamHI de 720 pb (contenant la partie 5' du gène FHV-1 gB) =
fragment B.

Le fragment A a été digéré par XbaI, puis phosphorylé. Le fragment B a été
digéré par BamHI, puis phosphorylé. Les fragments A et B ont ensuite été ligaturés
ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par XbaI et BamHI,
20 pour donner le plasmide pJCA075.

Les oligonucléotides suivants :

JCA158 (SEQ ID N°15) et JCA211 (SEQ ID N°16) (21 mer):

5' GTGGACACATATAGAAAGTCG 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pJCA075 un
25 fragment XbaI-bout franc de 510 pb (contenant le promoteur I3L fusionné à la partie
5' du gène FHV-1 gB mutée au niveau du signal TTTTNT) = fragment C.

Les oligonucléotides suivants :

JCA212 (SEQ ID N°17) (21 mer)

5' CACCTTCAGGATCTACTGTCG 3'

30 et JCA213 (SEQ ID N°13) (18 mer)

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pJCA001 un

fragment bout franc-BamHI de 330 pb (contenant la partie centrale du gène FHV-1 gB) = fragment D.

Le fragment C a été digéré par XbaI, puis phosphorylé. Le fragment D a été digéré par BamHI, puis phosphorylé. Les fragments C et D ont alors été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par XbaI et BamHI, pour donner le plasmide pJCA076.

Les oligonucléotides suivants :

JCA239 (SEQ ID N°18) (24 mer)

5' ACGCATGATGACAAGATTATTATC 3'

et JCA249 (SEQ ID N°19) (18 mer)

5' CTGTGGAATTCGCAATGC 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pJCA001 un fragment EcoRI-bout franc de 695 pb (contenant la première partie 3' du gène FHV1 gB) = fragment E. Les oligonucléotides suivants :

JCA221 (SEQ ID N°20) (48 mer)

5' AAAACTGCAGCCCGGGAAGCTTACAAAAATTAGATTTGTTTCAGTATC 3'

et JCA247 (SEQ ID N°21) (36 mer)

5' GGTATGGCAAATTTCTTTCAGGGACTCGGGGATGTG 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pJCA001 un fragment bout franc-PstI de 560 pb (contenant la seconde partie 3' du gène FHV-1 gB mutée au niveau du signal TTTTNT) = fragment F.

Le fragment E a été digéré par EcoRI, puis phosphorylé. Le fragment F a été digéré par PstI, puis phosphorylé. Les fragments E et F ont alors été ligaturés ensemble avec le vecteur pBI24 (International Biotechnologies Inc., New Haven, CT), préalablement digéré par EcoRI et PstI, pour donner le plasmide pJCA077 (contenant la cassette promoteur vaccine I3L-gène FHV-1 B).

Construction de la cassette d'expression 42K-FHV-1 gD

Les oligonucléotides suivants :

RG286 (SEQ ID N°22) (17 mer)

5' TTTATATTGTAATTATA 3'

et M13F (SEQ ID N°23)(17 mer)

5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide contenant le promoteur Entomopoxvirus AmEPV 42K (décrit dans l'exemple 21 du brevet US-A-5,505,941) un fragment EcoRI-bout franc de 130 pb (contenant le promoteur entomopox 42K) = fragment A. Les oligonucléotides suivants :

JCA234 (SEQ ID N°24) (21 mer)

5' ATGATGACACGTCTACATTTT 3'

et JCA235 (SEQ ID N°25) (21 mer)

5' TGTTACATAACGTA CTTCAGC 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice du plasmide pFHVEcoRIM un fragment bout franc-BamHI de 185 pb (contenant la partie 5' du gène FHV-1 gD) = fragment B. Le fragment A a été digéré par EcoRI, puis phosphorylé. Le fragment B a été digéré par BamHI, puis phosphorylé. Les fragments A et B ont alors été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par EcoRI et BamHI, pour donner le plasmide pJCA078.

Le plasmide pFHVEcoRIM (voir plus haut) a été digéré par BamHI et XhoI pour isoler le fragment BamHI-XhoI de 1270 pb (contenant la partie 3' du gène FHV-1 gD). Ce fragment a été alors ligaturé avec le vecteur pIBI24, préalablement digéré par BamHI et XhoI, pour donner le plasmide pJCA072. Les oligonucléotides suivants :

JCA242 (SEQ ID N°26) (18 mer)

5' GAGGATTCGAAACGGTCC 3'

et JCA237 (SEQ ID N°27) (53 mer)

5'AATTTTCTCGAGAAGCTTGTTAACAAAAATCATTAAAGGATGGTAGATTGCATG 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice pFHVEcoRIM un fragment XbaI-XhoI de 290 pb. Ce fragment a été digéré par XbaI et XhoI = fragment C (contenant la fin du gène FHV-1 gD).

Le plasmide pJCA072 a été digéré par XbaI et XhoI pour isoler le fragment XbaI-XhoI de 3575 pb (vecteur pIBI24 + début de la partie 3' du gène FHV-1 gD) = fragment D. Les fragments C et D ont alors été ligaturés ensemble pour donner le plasmide pJCA073.

Le plasmide pJCA073 a été digéré par BamHI et XhoI pour isoler le fragment

BamHI-XhoI de 960 pb (contenant la partie 3' du gène FHV-1 gD) = fragment A. Le plasmide pJCA078 a été digéré par HpaI et BamHI pour isoler le fragment HpaI-BamHI de 310 pb (contenant le promoteur 42K fusionné à la partie 5' du gène FHV-1 gD) = fragment B. Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par EcoRV et XhoI, pour donner le plasmide pJCA080 (contenant la cassette promoteur 42K-gène FHV-1 gD).

Construction de la cassette H6-FHV-1 gC

L'ADN génomique du virus FHV-1 (souche CO) a été digéré par EcoRI et le fragment EcoRI F d'environ 7500 pb a été cloné dans pBluescript SK+ pour donner le plasmide pFHVEcoRIF. Les oligonucléotides suivants :

JCA274 SEQ ID N°28)(55 mer)

5'CATTATCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAGACGATATAGGATGGGAC
3'

et JCA275 (SEQ ID N°29)(18 mer)

5' ACTATTTTCAATACTGAC 3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice pFHVEcoRIF un fragment qui a été digéré par NruI et Sall pour donner un fragment NruI-Sall de 107 pb (contenant la partie 3' du promoteur vaccine H6 fusionnée à la partie 5' du gène FHV-1 gC) = fragment A.

Les oligonucléotides suivants :

JCA276 (SEQ ID N°30) (18 mer)

5' AAATGTGTACCACGGGAC 3'

et JCA277 (SEQ ID N°31) (54 mer)

5'AAGAAGCTTCTGCAGAATTCGTTAACAAAAATCATTATAATCGCCGGGGATGAG
3'

ont été utilisés pour générer par PCR à partir de la matrice pFHVEcoRIF un fragment qui a été digéré par EcoRV et HindIII pour donner un fragment EcoRV-HindIII de 370 pb (contenant la partie 3' du gène FHV-1 gC et les sites HpaI-EcoRI-PstI-HindIII) = fragment B.

Le plasmide pJCA020 (voir plus haut) a été digéré par NruI et HindIII pour isoler le fragment HindIII-NruI (contenant la partie 5' du promoteur vaccine H6) = fragment

C. Le plasmide pFHV_{EcoRIF} a été digéré par BamHI et *EccRV* pour isoler le fragment BamHI-*EcoRV* de 580 pb (contenant la partie centrale du gène FHV-1 gC) = fragment D.

5 D. Les fragments A et C ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par HindIII et Sall pour donner le plasmide pJCA097. Les fragments B et D ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par BamHI et HindIII, pour donner le plasmide pJCA099.

10 Le plasmide pJCA097 a été digéré par PstI et Sall pour isoler le fragment PstI-Sall de 200 pb (contenant la cassette H6-partie 5' de gC) = fragment E. Le plasmide pFHV1_{EcoRIF} a été digéré par BamHI et Sall pour isoler le fragment Sall-BamHI de 600 p (2ème partie centrale de FHV-1 gC) = fragment F. Les fragments E et F ont alors été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par BamHI et PstI, pour donner le plasmide pJCA098. Le plasmide pJCA098 a ensuite été digéré par *EcoRI* et BamHI pour isoler le fragment *EcoRI*-BamHI de 820 pb (contenant la cassette H6-partie 5' de FHV-1gC) = fragment G. Le plasmide pJCA099 (voir plus haut) a été digéré par BamHI et HindIII pour isoler le fragment BamHI-HindIII de 960 pb (contenant la partie 3' du gène FHV-1 gC) = fragment H. Les fragments G et H ont alors été ligaturés ensemble avec le vecteur pBluescript SK+, préalablement digéré par *EcoRV* et HindIII, pour donner le plasmide pJCA100 (contenant la cassette d'expression promoteur vaccine H6-gène FHV-1 gC).

20 Le plasmide pJCA100 a été digéré par *NruI* et *EcoRI* pour isoler le fragment *NruI*-*EcoRI* de 1650 pb contenant la partie 3' du promoteur H6 fusionnée au gène FHV-1 gC. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pJCA053 (cassette VQH6-IBV M dans le vecteur pBluescript SK+), préalablement digéré par *NruI* et *EcoRI*, pour donner le plasmide pJCA108 (contenant la cassette VQH6-gC dans pBluescript SK+). Le plasmide pJCA079 (voir plus haut) a été digéré par *SmaI* et BamHI pour isoler le fragment BamHI-*SmaI* de 840 pb (contenant la cassette I3L-partie 5' du gène FHV-1 gB) = fragment A. Le plasmide pJCA079 a également été digéré par BamHI et HindIII pour isoler le fragment BamHI-HindIII de 2155 pb (contenant la partie 3' du gène FHV-1 gB) = fragment B. Le plasmide pJCA108 (voir plus haut) a été digéré par HindIII et *EcoRI* pour isoler le fragment HindIII-*EcoRI* de 1830 pb (contenant la cassette VQH6-FHV-1 gC) = fragment C. Le plasmide pJCA080 (voir plus haut) a été digéré par *EcoRI*

25

30

et XhoI pour isoler le fragment EcoRI-XhoI de 1275 pb (contenant la cassette 42K-gène FHV-1 gD) = fragment D. Les fragments A, B, C et D ont alors été ligaturés ensemble avec le plasmide donneur pC6L pour donner le plasmide pJCA109.

5 Ce plasmide contient les cassettes d'expression H6-gène FHV-1 gC, I3L-gène FHV-1 gB et 42K-gène FHV-1 gD dans le locus C6 du virus ALVAC. La structure de ce plasmide a été vérifiée par séquençage et carte de restriction complète.

Ce plasmide est le plasmide donneur pour l'insertion des cassettes d'expression H6-gène FHV-1 gC, I3L-gène FHV-1 gB et 42K-gène FHV-1 gD dans le locus C6 du virus ALVAC.

10 Après linéarisation par NotI, le plasmide pJCA109 a été utilisé comme plasmide donneur pour la recombinaison *in vitro* (Piccini *et al.* Methods in Enzymology. 1987. 153. 545-563) avec le virus ALVAC pour générer le virus recombiné désigné **vCP243**.

Exemple 8 : Adjuvant

15 Le carbomère utilisé dans les vaccins conformes à la présente invention est le Carbopol® 974P fabriqué par la société BF Goodrich (PM environ 3 millions).

On prépare tout d'abord une solution mère à 1,5 % P/V de Carbopol® 974P dans de l'eau distillée contenant du chlorure de sodium à 1 g/l.

20 Cette solution mère est ensuite utilisée pour la fabrication d'une solution de Carbopol® en eau physiologique à 4 mg/ml. La solution mère est versée dans la totalité de l'eau physiologique (ou éventuellement dans la majorité de celle-ci) en 1 fois ou éventuellement en plusieurs fois avec à chaque fois l'ajustement du pH à l'aide de NaOH (par exemple 1 N ou plus concentré) à une valeur d'environ 7,3 à 7,4.

25 On obtient alors une solution de Carbopol® prête à l'emploi qui pourra être utilisée par l'utilisateur final pour reprendre un vaccin recombinant lyophilisé.

Exemple 9 : Vaccination des chevaux à l'aide du vecteur canarypox recombinant vPC132 (voir exemple 6) exprimant les glycoprotéines gB, gC et gD de l'herpès virus équin de type I (EHV-1).

30 1. Protocole d'immunisation et épreuve :

20 poneys (Welsh mountain ponies) ne présentant pas de signes sérologiques

traduisant une exposition récente à EHV-1 et EHV-4 ont été répartis au hasard en 4 groupes (A à D) de 5 poneys.

Les groupes A et B ont été vaccinés avec le canarypox recombinant vCP132 exprimant les glycoprotéines gB, gC et gD de la souche Kentucky D de EHV-1. Le vaccin a été repris dans de l'eau stérile (groupe A) ou dans une solution de carbomère 4 mg/ml (groupe B) selon l'exemple 8.

Le groupe C a été vacciné avec un vaccin EHV entier inactivé du commerce contenant, sous un volume de dose de 1,5 ml, des valences EHV-1 et EHV-4 inactivées et 6 mg de carbomère.

Le groupe D est le groupe témoin dans lequel les animaux ont été vaccinés avec un virus canarypox recombinant vCP1502 exprimant la glycoprotéine HA du virus Influenza A/equi-1/Prague56 (voir exemple 3) repris dans du carbomère dans les mêmes conditions que pour le groupe B.

Les vaccins sont décrits en détail dans le tableau I :

Groupes	Vaccins	Antigènes	Diluant / Adjuvant	Dose (1 ml)
A	vCP132	EHV-1	Eau stérile	$10^{8,0}$ TCID ₅₀
B	vCP132	EHV-1	Carbopol ® 974P	$10^{8,0}$ TCID ₅₀
C	vaccin du commerce	EHV-1 EHV-4	Carbopol®	$10^{7,3}$ TCID ₅₀ avant inactivation EHV-1 $10^{7,3}$ TCID ₅₀ avant inactivation EHV-4
D	vCP1502	HA-Prague 56	Carbopol® 974P	10^8 TCID ₅₀

Chaque animal a reçu 1 dose du vaccin correspondant à J0 et J35 par injection intramusculaire profonde dans le cou.

A J 56, les poneys ont été éprouvés par instillation intra-nasale de 10^5 TCID₅₀ de la souche Ab4/8 de EHV-1.

5 2. Tests sérologiques :

On a réalisé des tests de neutralisation SN selon la technique décrite dans Thompson et al., Equine Vet. J., 8, 58-65, 1976. Le virus EHV-1 (RACH) a été utilisé comme antigène.

10 Les titres SN sont exprimés comme l'inverse de la dilution de sérum donnant 50 % de neutralisation (\log_{10}).

3. Suivi virologique :

15 L'expression de virus a été suivie quotidiennement sur 10 jours par écouvillonnages nasopharyngés que l'on a récolté dans du milieu de transport de virus. Les extraits d'écouvillonnage ont été titrés sur des cellules de reins de lapins RK13 dans des plaques de microtitration. Les titres ont été calculés en utilisant la formule de Karber exprimée en \log_{10} TCID₅₀ pour 1 ml.

4. Résultats :

Aucune réaction locale ou systémique significative n'a été notée suite à ces vaccinations.

20 Les réponses en anticorps séroneutralisants SN (\log_{10} de la dilution entraînant 50 % de neutralisation) moyennes sont :

Groupe	titre à J.0	titre à J.56 (avant épreuve)
A	$1,69 \pm 0,49$	$1,93 \pm 0,15$
B	$1,69 \pm 0,47$	$2,61 \pm 0,42$
25 C	$1,19 \pm 0,30$	$2,47 \pm 0,32$
D	$1,57 \pm 0,45$	$1,55 \pm 0,37$

On observe avec le vaccin vCP132 en carbomère une augmentation significative du titre en anticorps.

30 La totalité des 5 poneys témoins excrète du virus par le nasopharynx. L'excrétion virale chez ces poneys non vaccinés a continué pendant une moyenne de

5 jours, avec un maximum d'excrétion virale à 4 jours post-infection.

Tous les poneys des groupes A, C, D excrètent du virus après épreuve. Au contraire seuls deux poneys sur les 5 poneys du groupe B vaccinés selon l'invention excrètent du virus. En outre, la quantité de virus excrétée dans le groupe B est
5 significativement inférieure à la quantité excrétée par les autres groupes y compris le groupe C. De même, la durée d'excrétion chez les animaux du groupe B est beaucoup plus courte que dans les autres groupes.

On peut se reporter à la figure 1 et aux valeurs d'aire sous la courbes données ci-après, qui font apparaître très clairement la quasi-absence d'excrétion virale chez
10 les poneys vaccinés par le vCP132 en présence de carbomère. Le résultat est très significatif si on le compare en particulier au vaccin commercial. On constate une réduction significative de l'excrétion virale chez les animaux du groupe B par rapport aux témoins, alors qu'il n'est pas constaté de différence significative entre les animaux du groupe C et les témoins. Cette réduction d'un degré remarquable et inattendu de
15 l'excrétion de virus est particulièrement intéressante pour ses implications très favorables sur la limitation de la transmission du virus de cheval à cheval.

Virus total par poney (aire sous la courbe) :

A : 17,1

20 B : 3,0

C : 9,7

D : 16,3

**Exemple 10 : vaccination de chevaux à l'aide du vecteur canarypox
25 vCP1533 (voir exemple 5) recombinant exprimant la glycoprotéine HA du virus Influenza A/equi-2/Newmarket/2/93 en présence de carbomère :**

1. Protocole d'immunisation et épreuve :

20 poneys (Welsch mountain ponies), de 7 à 8 mois d'âge, ne présentant pas d'anticorps détectables contre les virus H3N8 et H7N7, mesurés par le test SRH (pour
30 single radial hemolysis ou hémolyse radiale simple), ont été utilisés dans cette étude. Le statut négatif des animaux permet d'étudier dans les meilleures conditions

l'efficacité des différents vaccins en termes de réponse humorale. Les poneys ont été répartis au hasard en 4 groupes (A à D) de 5 à 6 poneys.

Les poneys du groupe A ont été vaccinés à l'aide d'un canarypox recombinant (vCP1533) exprimant la glycoprotéine HA du virus influenza A/equi-2/Newmarket/2/93.

5 Ce vaccin a été repris dans une solution contenant 4 mg/ml de carbomère, carbopol® 974P.

Le groupe B a été vacciné avec un vaccin commercial contenant, sous un volume de dose de 1,5 ml, un mélange de 3 souches inactivées d'Influenza à savoir Prague/56, Suffolk/89 et Miami/63, de l'anatoxine tétanique, ainsi que du carbomère
10 (4 mg) et de l'hydroxyde d'aluminium (2,2 mg) comme adjuvants.

Le groupe C a été vacciné à l'aide d'un vaccin C comprenant 2 valences inactivées Influenza à savoir Prague/56, Newmarket/2/93, ainsi que de l'anatoxine tétanique, dans de l'hydroxyde d'aluminium.

Le groupe D a été vacciné à l'aide d'un vecteur canarypox recombinant vCP132
15 vu ci-dessus et reconstitué avec une solution contenant 4 mg/ml de carbomère 974P. Ce dernier groupe a servi de témoin pour l'épreuve.

20

25

30

Les vaccins sont décrits en détails dans le tableau II :

Groupes	Vaccins	Antigènes	Diluant / Adjuvant	Dose (1 ml)
A	vCP1533	HA-Newmarket/2/93	Carbopol® 974P	$10^{7.7}$ TCID ₅₀
B	Vaccin du commerce	Prague/56 ; Suffolk/89 Miami/63 ; anatoxine tétanique	Carbopol® Al(OH) ₃	15 µgHA de chaque souche
C	Vaccin C	Prague/56 ; Newmarket/2/93 anatoxine tétanique	Al(OH) ₃	15 µg HA de chaque souche
D	vCP132	gB, gC, gD - EHV-1	Carbopol® 974P	$10^{8.0}$ TCID ₅₀

2 doses de 1 ml de chaque vaccin ont été administrées à chaque animal à 5 semaines d'intervalle par injection intramusculaire profonde dans le cou.

2 semaines après la deuxième vaccination, chaque poney a été infecté par exposition à un aérosol provenant d'environ 20 ml de fluide allantoïdien pour un total de $10^{7.3}$ EID₅₀ de virus influenza A-equi-2/Sussex/89, en utilisant un nébulisateur de modèle ULTRA 2000 (De Villbiss, Somerset PA) comme décrit par Mumford et al, Equine Vet, J., 22 : 93-98, 1990.

2. Test sérologique :

Des échantillons de sang total ont été collectés aux jours suivants : 0 (le même jour que et avant la première vaccination), 7, 14, 35 (le même jour que et avant la deuxième vaccination), 49 (le même jour que et avant l'épreuve), 56 et 63.

Le sérum a été préparé et stocké et conservé par congélation à - 20° C jusqu'à son utilisation. Tous les sérums ont été testés pour la présence d'anticorps SRH vis-à-vis de Influenza A/equi-1/Prague/56 et Influenza A/equi-2/Newmarket/2/93 comme décrit par Wood et al. (J. Hyg., 90 : 371-384, 1983).

Les diamètres des zones d'hémolyse ont été mesurés dans deux directions à angle droit en utilisant un lecteur automatique. La superficie des zones a été calculée et une augmentation de 50 % a été considérée comme significative. Les titres ont été exprimés en mm² d'hémolyse.

5 3. Suivi virologique.

10 L'excrétion virale a été suivie quotidiennement sur 10 jours en récoltant des écouvillonnages nasopharyngés dans un milieu de transport de virus. L'exsudat de chaque écouvillonnage a été dilué par dilutions de raison 10 dans du PBS à pH7,2 et 0,1 ml de chaque dilution a été inoculé dans l'espace allantoïdien d'oeufs embryonnés de 10 jours d'âge. Le titre viral (EID₅₀/ml) dans les extraits des écouvillonnages a été calculé à partir de l'activité hémagglutinante dans des liquides allantoïdiens récoltés après 72 heures d'incubation des oeufs à 34 ° C.

15 4. Résultats.

Il n'a pas été constaté de réaction locale ou systémique significative à la suite de la première vaccination à l'exception d'un cheval du groupe B.

A noter que les souches Suffolk et Newmarket sont semblables (Daly et al., J. Gen. Virol. 1996. 77. 661-671), ce qui rend parfaitement valable la comparaison avec le vaccin commercial dans les conditions de l'essai.

20 Aucun des poneys n'avait d'anticorps SRH détectable contre Influenza A/equi-2/Newmarket/2/93 ou Influenza A/equi-1/Prague/56 au début de l'étude. Les résultats sérologiques à 1 semaine après la première vaccination ont montré qu'aucun des poneys n'avait été préalablement infecté par Influenza (pas d'effet rappel observable).

25 2 semaines après la première vaccination, aucun des poneys n'a développé de réponse en anticorps détectable contre Influenza A/equi-1/Prague/56. En outre, il n'y a pas eu d'anticorps SRH détectable contre Influenza A/equi-2/Newmarket/93 chez 6 animaux sur 6 vaccinés avec vaccin C, chez 4 animaux sur 5 vaccinés avec le vaccin du commerce B et dans le groupe témoin D. Au contraire, un titre en anticorps SRH très fort a été constaté chez l'ensemble des 5 poneys vaccinés avec le canarypox en présence de l'adjuvant carbomère : moyenne 155,4 ± 32,9. Le tableau III suivant
30 présente les résultats obtenus animal par animal en ce qui concerne les titres en anticorps SRH.

Tableau III Résultats SRH (mm²)

Poneys	Groupe	PRAGUE (J0, J7, J14)	NEWMARKET		
			J0	J7	J14
M26	A	0	0	0	158.0
M27	A	0	0	0	104.2
M28	A	0	0	0	160.3
M29	A	0	0	0	196.4
M30	A	0	0	0	158.0
M31	B	0	0	0	0
M32	B	0	0	0	0
M33	B	0	0	0	0
M34	B	0	0	0	0
M35	B	0	0	0	81.2
M36	C	0	0	0	0
M37	C	0	0	0	trace
M38	C	0	0	0	0
M39	C	0	0	0	0
M40	C	0	0	0	trace
M41	C	0	0	0	0
M42	D	0	0	0	0
M43	D	0	0	0	0
M44	D	0	0	0	0
M45	D	0	0	0	0
M46	D	0	0	0	0

Le vaccin selon l'invention conduit à l'apparition d'un haut titre en anticorps dès 14 jours après la première vaccination alors que, globalement, pour les vaccins B et C, la première vaccination n'entraîne pas à cette date l'apparition d'anticorps à des niveaux détectables. L'obtention aussi précoce d'un tel titre est un résultat remarquable

et inattendu, jamais constaté auparavant.

Exemple 11 : Vaccination des chevaux à l'aide du vecteur canarypox vCP1502 (voir exemple 3) recombinant exprimant la glycoprotéine HA du virus influenza A/equi-1/Prague 56 en présence de carbomère

Les témoins de l'exemple 1, vaccinés par vCP1502, ont aussi été suivis sur le plan sérologique.

Le tableau IV suivant montre les titres IHA (inhibition de l'hémagglutination) obtenus chez les animaux immunisés avec 10^8 pfu de vCP1502 avec Carbopol® 974P à 0 (1ère injection V1) et 35 (2ème injection V2) jours.

Tableau IV

	titres anti-H7N7 IHA				
Poneys	jour 0 (V1)	jour 7	jour 14	jour 35 (V2)	jour 56
RM16	0	0	128	64	128
RM17	0	0	32	128	256
RM18	0	0	16	64	512
RM19	0	0	32	32	256
RM20	0	0	128	64	128

Comme dans l'exemple précédent, on constate que l'injection d'un canarypox -EIV (exprimant le gène HA du virus A équi-1/Prague) mélangé à du carbomère permet l'obtention de titres IHA spécifiques élevés dès J14 après une vaccination. De manière remarquable, ces titres élevés sont encore augmentés de manière significative après rappel pour atteindre un titre moyen très élevé, d'un niveau jamais constaté auparavant pour l'antigène HA de virus EIV H7N7 sur chevaux non primo-stimulés.

Exemple 12 : application chez le chat

Le virus recombiné testé est un virus canarypox recombiné exprimant les gènes gB, gC et gD de l'herpèsvirus félin (Feline Herpesvirus = FHV). Ce virus recombiné est identifié vCP243 (voir exemple 7).

Le protocole de vaccination/épreuve dans le modèle FHV est le suivant.

Groupe	Nombre de chats	Vaccin	Diluant / Adjuvant	Dose
A	6	vCP243	eau	$10^{7.5}$ pfu
B	6	vCP243	Carbopol® 974P	$10^{7.5}$ pfu
C	6	CORIFELIN®	—	1 dose commerciale
D (témoins)	6	—	—	—

Les chats sont vaccinés à J0 et J28 par voie sous-cutanée.

Le vaccin CORIFELIN® est un vaccin FHV sous-unités commercialisé par Merial, Lyon, France, comprenant au moins 200 unités IDR de fractions virales de FHV, 25 µg d'antigène purifié de calicivirus félin, 0,1 mg du thiomersal et de l'excipient huileux QSP 1 ml.

L'épreuve est effectuée à J49, par voie oronasale d'une souche d'épreuve FHV.

Le suivi clinique est effectué pendant 14 jours après épreuve en notant les signes cliniques (notation des signes cliniques selon les règles de la Pharmacopée Européenne).

La protection est appréciée après d'épreuve sur les critères suivants :

- scores cliniques moyens de chaque groupe, comparés entre eux et au score clinique moyen du groupe témoin
- niveau d'excrétion virale FHV après épreuve (mesure de la charge virale dans des écouvillonnages pharyngés réalisés quotidiennement de J0 à J10 après épreuve)
- titres anticorps neutralisants le virus FHV sur prises de sang à J0, J28, J49, J63.

Pour tous ces critères, les taux moyens de chaque groupe sont également comparés entre eux et au taux moyen du groupe témoin.

Exemple 13 : application chez le chien

Le virus recombiné testé est un virus canarypox recombiné exprimant les gènes HA et F du virus de la maladie de Carré (Canine Distemper Virus, CDV). Ce virus

recombiné est identifié **vCP258** (voir exemple 2).

Le protocole de vaccination/épreuve dans le modèle CDV est le suivant.

Groupe	Nombre de chiens	Vaccin	Diluant / Adjuvant	Dose
A	6	vCP258	eau	$10^{7,0}$ pfu
B	6	vCP258	carbopol® 974P	$10^{7,0}$ pfu
C	6	EURICAN®	—	1 dose commerciale
D (témoins)	6	—	—	—

Les chiens sont vaccinés à J0 et J28 par voie sous-cutanée.

Le vaccin EURICAN® (CHPPI2) est un vaccin vivant commercialisé par Merial, Lyon, France. Une dose commerciale contient au minimum 10^4 pfu de la souche vaccinale CDV Onderstepoort.

L'épreuve est effectuée à J56, par administration intracrânienne d'une dilution au 1/10ème de la souche d'épreuve CDV "Snyder-Hill" (lot préparé et fourni par l'USDA). Le suivi clinique est effectué pendant 21 jours après épreuve en notant les signes cliniques (notation des signes cliniques selon les règles de la Pharmacopée Européenne).

La protection est appréciée après épreuve sur les critères suivants :

- scores cliniques moyens de chaque groupe, comparés entre eux et au score clinique moyen du groupe témoin
- niveau de virémie CDV après épreuve (mesure de la charge virale dans les lymphocytes à J56, J61, J63, J66, J70, J77)
- titres anticorps neutralisants le virus CDV à J0, J14, J28, J42, J56, J63, J77.

Pour tous ces critères, les taux moyens de chaque groupe sont également comparés entre eux et au taux moyen du groupe témoin.

REVENDEICATIONS

1. Vaccin vivant recombinant comprenant un vecteur viral incorporant et exprimant in vivo une séquence nucléotidique hétérologue, de préférence un gène d'un agent pathogène, et au moins un composé adjuvant choisi parmi les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique et les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle.

2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend comme composé adjuvant un polymère de l'acide acrylique ou méthacrylique réticulé par un éther polyalcénylique de sucre ou de polyalcool.

3. Vaccin selon la revendication 2, caractérisé en ce que le polymère est réticulé par un allyl saccharose ou par de l'allylpentaérythritol.

4. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend comme composé adjuvant un copolymère d'anhydride maléique et d'éthylène réticulé, par exemple par du divinyléther.

5. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé adjuvant est présent dans le vaccin à raison de 0,01 % à 2 % P/V.

6. Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce que la concentration est de 0,06 à 1 % en P/V, de préférence de 0,1 à 0,6 % en P/V.

7. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur incorporant et exprimant au moins un gène d'un herpèsvirus animal.

8. Vaccin selon la revendication 7, caractérisé en ce que le gène provient d'un herpèsvirus choisi dans le groupe consistant en herpès virus équin EHV-1 et/ou EHV-4, herpès virus félin FHV, herpèsvirus canin CHV, herpèsvirus aviaire ILTV ou Marek, herpèsvirus bovin BHV et herpèsvirus porcine PRV.

9. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur incorporant et exprimant au moins un gène d'un virus influenza.

10. Vaccin selon la revendication 9, caractérisé en ce que le vecteur incorporé exprime un gène d'un virus influenza choisi dans le groupe consistant en virus grippe équine, grippe aviaire et grippe porcine.

11. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il

comprend un vecteur incorporant et exprimant au moins un gène d'un virus animal choisi dans le groupe consistant en virus de la leucémie féline FeLV, virus de la maladie de Carré CDV, ou la toxine tétanique.

5 12. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le vecteur viral est choisi dans le groupe consistant en poxvirus, adénovirus, herpèsvirus.

13. Vaccin selon la revendication 12, caractérisé en ce que le poxvirus est choisi dans le groupe consistant en virus de la vaccine, fowlpox, canarypox, pigeonpox, swinepox.

10 14. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un canarypox incorporant et exprimant les gènes gB, gC et gD du virus herpès équin EHV-1 ou EHV-4.

15 15. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend deux ou trois vecteurs canarypox comprenant chacun un gène HA du virus influenza équin, chaque gène HA provenant d'une souche différente.

16. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur canarypox comprenant deux ou trois gènes HA de souches différentes de virus influenza équin.

20 17. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur canarypox comprenant et exprimant les gènes gB, gC et gD de l'herpèsvirus félin FHV.

18. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend un vecteur canarypox incorporant et exprimant les gènes HA et F du virus de la maladie de Carré CDV.

25 19. Utilisation d'un composé choisi parmi les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique et les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour la production d'un vaccin vivant recombiné incorporant et exprimant in vivo une séquence nucléotidique hétérologue.

30 20. Ensemble de vaccination comprenant, conditionnés séparément, d'une part, sous forme lyophilisée, un vaccin vivant recombinant comprenant un vecteur viral

incorporant et exprimant in vivo une séquence nucléotidique hétérologue, de
préférence un gène d'un agent pathogène, et d'autre part une solution d'au moins un
composé adjuvant choisi parmi les polymères de l'acide acrylique ou méthacrylique et
les copolymères d'anhydride maléique et de dérivé alcényle, tel que défini dans l'une
5 quelconque des revendications 1 à 6.

10

15

20

25

30

35

40

1/4

1 ATGAAGACAA CCATTATTTT GATACTACTG ACCCATTGGG
41 TCTACAGTCA AAACCCAACC AGTGGCAACA ACACAGCCAC
81 ATTATGTCTG GGACACCATG CAGTAGCAAA TGGAACATTG
121 GTAAAAACAA TAACTGATGA CCAAATTGAG GTGACAAATG
161 CTA CTGAATT AGTCCAGAGC ATTTCAATAG GGAAAATATG
201 CAACAACTCA TATAGGGTTC TAGATGGAAG AAATTGCACA
241 TTAATAGATG CAATGCTAGG AGACCCCCAT TGTGATGATT
281 TTCAGTATGA GAATTGGGAC CTCTTCATAG AAAGAAGCAG
321 CGCTTTCAGC AATTGCTACC CATATGACAT CCCTGACTAT
361 GCATCGCTCC GGTCCATTGT AGCATCCTCA GGAACATTAG
401 AATTCACAGC AGAGGGGGTTC ACATGGACAG GTGTCACTCA
441 AAACGGAAGA AGTGGAGCCT GCAAAAGGGG ATCAGCCGAT
481 AGTTTCTTTA GCCGACTGAA TTGGCTAACA AAATCTGGAA
521 ATTCTTACCC CATATTGAAT GTGACAATGC CTAACAATAA
561 AAATTTTCGAT AAACATATA TCTGGGGGAT TCATCACCCG
601 AGCTCAAACA AAGAGCAGAC AAAATTATAT ATCCAAGAAT
641 CAGGACGAGT AACAGTCTCA ACAGAAAGAA GTCAACAAAC
681 AGTAATCCCT AACATCGGAT CTAGGCCGTG GGTGAGGGGT
721 CAATCAGGCA GGATAAGCAT ATACTGGACC ATTGTAAAAC
761 CTGGAGATAT TCTAATGATA AACAGTAATG GCAACTTAGT
801 TGCACCGCGG GGATATTTTA AATTGAGAAC AGGGAAAAGC
841 TCTGTAATGA GATCAGATGC ACTCATAGAC ACTTGTGTGT
881 CTGAATGTAT TACACCAAAT GGAAGCATCC CCAACGACAA
921 ACCATTTCAA AATGTGAACA AAATTACATA TGGAAAATGC
961 CCAAGTATA TCAGGCCAAA CACTTTAAAG CTGGCCACTG
1001 GGATGAGGAA TGTACCAGAA AAGCAAATCA GAGGAATCTT
1041 TGGAGCAATA GCGGGATTCA TAGAAAACGG CTGGGAAGGA
1081 ATGGTTGATG GGTGGTATGG ATTCCGATAT CAAAACTCGG
1121 AAGGAACAGG ACAAGCTGCA GATCTAAAGA GCACTCAAGC
1161 AGCCATAGAC CAGATCAATG GAAAATTAAA CAGAGTGATT
1201 GAAAGGACCA ATGAGAAATT CCATCAAATA GAAAAGGAAT
1241 TCTCAGAAGT AGAAGGGAGA ATCCAGGATT TGGAGAAGTA
1281 TGTAGAAGAC ACCAAAATAG ACCTATGGTC CTACAATGCA
1321 GAATTGCTGG TGGCTCTAGA AAATCAACAT ACAATTGACT
1361 TAACAGATGC AGAAATGAAT AAATTATTCG AGAAGACTAG
1401 GCGCCAGTTA AGAGAAAACG CGGAAGACAT GGGAGGTGGA
1441 TGTTTCAAGA TTTACCACAA ATGTGATAAT GCATGCATTG
1481 GATCAATAAG AAATGGGACA TATGACCATT ACATATACAG
1521 AGATGAAGCA TTAAACAACC GATTTCAAAT CAAAAGTGTT
1561 GAGTTGAAAT CAGGCTACAA AGATTGGATA CTGTGGATT
1601 CATTGCGCAT ATCATGCTTC TTAATTGCG TTGTTCTATT
1641 GGGTTTCATT ATGTGGGCTT GCCAAAAGG CAACATCAGG
1681 TGCAACATTT GCATTTGA

FIG.1

```

1  ATGTATGGTT ACTGGGCTGGA ATGTGTTATT TGTACAGTCA TATGTAATGT ACCACTCAAC
61  ACCGATATATT TATATCGCGG TTGTGTTCTAA TAACTGTTTT TAAATAAAGA GATAAGTCGA
121  AATCACAGGC AGTGAAATGC CTTAAATAATG GGTCTCCTGT CTATGTTAGG AATCTCTTAT
181  TTTAAGTAGT CCGCGAGAGC GATTACATC CCGGGATCAC CAACAATCTG CGATGAGACG
241  ATATAGGATG GGACGCGGAA TCTACCTTCT CTATATCTGT CTGTTATATA CATACTCTCA
301  GTTTGGTACT TCGTCGACAA CCGCGGTCAG TATTGAAAAT AGTGATAATA GTACTGCCGA
361  GATGTTATCA TCTACCAGCA TGTCCGCTAC CACCCCGATA TCCAGACCAA CATCTCCATT
421  CACTACTCCA ACTAGAAGAT CTACAAATAT AGCTACAAGT TCGAGTACCA CCCAGGCATC
481  CCAGCCCAACA TCTACATTAA CTACTCTAAC TAGAAGCTCG ACAACTATAG CTACAAGTCC
541  GAGTACCACC CAGGCAGCCA CATTCAATAG ATCATCTACC GATTCCAATA CCACCTTACT
601  CAAAACAACA AAAAAACCAA AGCGTAAAAA GAATAAGAAT AACGGGGCCA GATTTAAATT
661  AGATTGTGGA TATAAGGGG TTATCTACAG ACCGTATTTT AGCCCTCTTC AGCTAAACTG
721  TACTCTACCC ACAGAACCTC ATATTACCAA CCTATTGAC TTCGAGATCT GGTTTAAACC
781  ACGCACCGA TTTGGGGATT TTCTTGGGGA TAAAGAAGAC TGGGAGTGTT AATCCATGG ATCTTGGGGA
841  CACCAGCATA TTAATAATTA GCAGCCGTAA TGGGAGTGT ACCAGATTAC ACATTATATA ATATTCCCAT
901  CGCGACACTC GGGATCCTAC AATCTAGGAT CATGGGAAT CAAATCTGTG GAATCTGCCA CGTCCGGTGT
961  ACAACATACC GAAGCGATGT CATGGGAAT GTGGAGATGG ACTAAATAAA ACAGTGCTAG GACAGGTAAA
1021  TTATACATGG CGGGTCTATG GTGGAGATGG GTGGAGATGG CGTAAATCTT ACACCCGCGG CCAGTCTATT
1081  TGTATCTGTA GTGGCATATC ACCCCCGGAG CGTAAATCTT ACACCCGCGG CCAGTCTATT
1141  TAATAAGACC TTTGAGGCGG TATGTGCAGT GGCGAATTAC ATTTCCAGATA CCGCAAGTGT
1201  AACATGGTAT CTTGACGGGA AGCCAATAGA AAGCAATAC AAGCAATAC AAGCAATAC AAGCAATAC
1261  ATGGATAGAT GGAATCATCA CCAGAAAGTTC TGTGTTGGCT ATTCCGACAA CTGAAACAGA
1321  TTCCGAGAAA CCAGATATAC GATGTGATTT GGAATGGCAT GAAAGTCCCTG TGTCCCTATAA
1381  GAGATTACAG AAAAGTGTAG CCCCGGACGT CTATTACCCA CTAATCTGTGT CTGTTACCTT
1441  CGCTGATACA CCGGCTATAT GTGATGTAA ATGTGTACCA CCGGACGGGA TATCCTTGAT

```

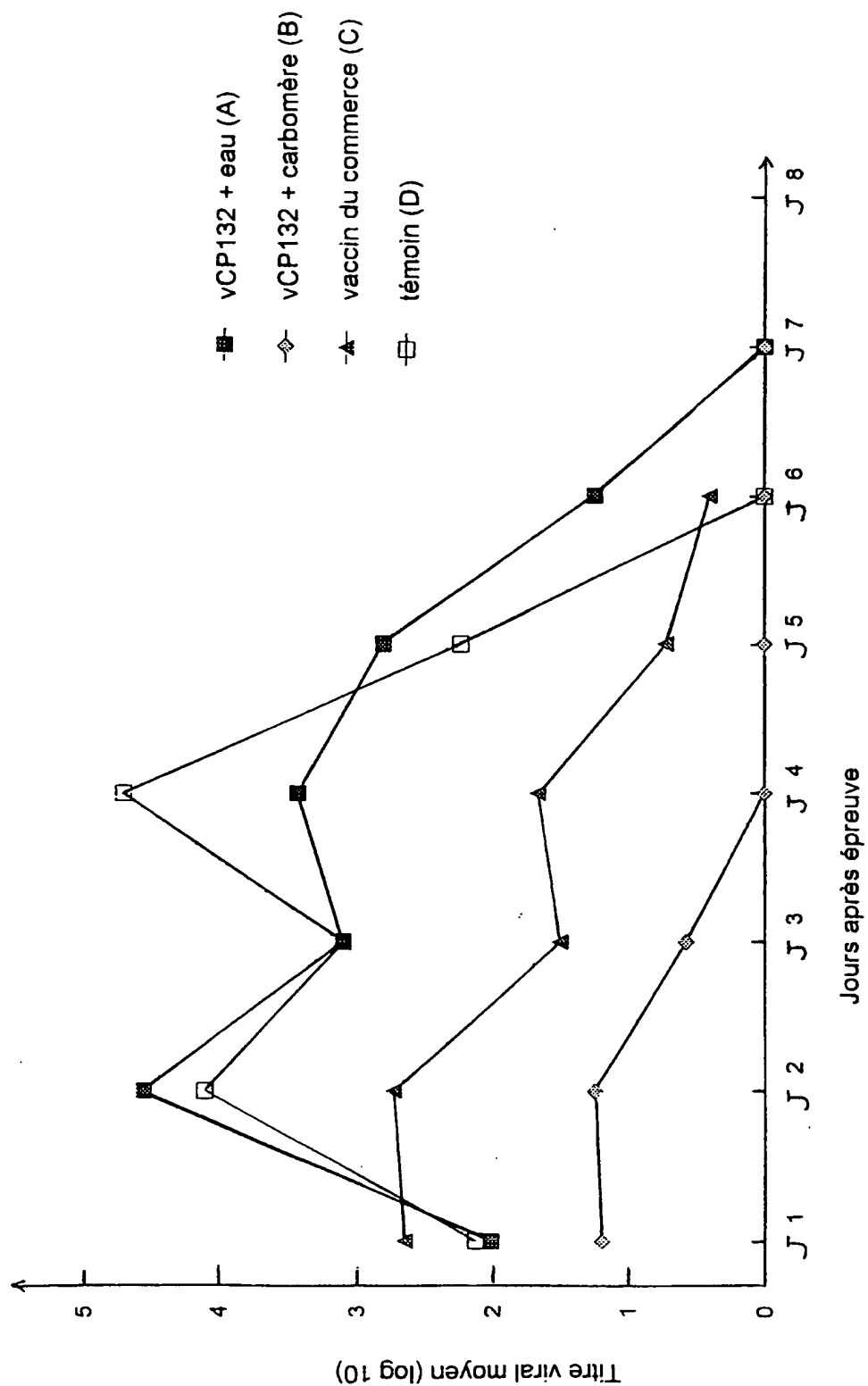
FIG. 2

3/4

1501 GTGGAAAATT GGTAACCTACC ATCTACCAAA AGCAATGAGT GCTGATATAC TGATCACAGG
 1561 TCCGTGTATA GAACGTCCAG GTTTGGTCAA CATTCAGAGT ATGTGTGATA TATCAGAAAC
 1621 GGATGGACCC GTGAGTTATA CCTGTCCAGC CATCGGATAC CCACCAATC TACCGGGATT
 1681 TTACGACACA CAAGTCTACG ACGCGTCCC GAGCTGTTCT CATCACAGTC TTTATCCTTA TTACGGCATT
 1741 TGTGTTGCT GTAATACTAG TATTCTCATC CCCGGCGATT ATAACTCTTA TAGTTCGTAT AAATTACTTA
 1801 ATGTTTATAT TATTCTCATC CCCGGCGATT ATAACTCTTA TAGTTCGTAT AAATTACTTA
 1861 TCATAACCGT GTTTCAGCGG TTATAATTTT ATAACAGTTA ATTGTTTACT AATAGTTTAC
 1921 AAAGTCCATC GTTTATAAAA AACAGCCCCA GTGGTATTAT AATCAATCGT ATGGATATAA
 1981 ACCGACTCCA ATCCGTGATC TTTGGTAAAC CGCGACGTAA TTAATCTCAC ACATTTTAAC
 2041 TAGTCTACGA TCACCCAGAT ATAATAAAAA GATTCGCGTG GACATGCAAG GTATGAGGTC
 2101 TACGTCACAG CCGTTGGTCG AGATAACCACT GTTAGATATG GAACCAACAG CATCTATACA
 2161 CTCCAACGAG CCTAACCCAC CGAATAAAAT GTTGACGACA GCTATTTCAT CGCGTAGGAG
 2221 TGGAAATTTT TTATTTTCTC TGGGTATGTT TTTTTCGGA GTTATCCTAA CAGCTACTAT
 2281 TATAGTATGT ACATTCATAT TTACAATACC AGTGGATATG CTCCAGATGC CACGCTGCCC
 2341 TGAGGAAACG GTGGGTATCA AAAACTGTTG TATCCGACCG ATTAGACGCC ATGTTAAATC
 2401 ACACCAAGAT CTAGTTGCCA CATGTGCCGA ATACATGGAA CAACCCGCCG GCCGCATCTG
 2461 CTGTTGGAGC GCTTATACCA TTATTGGACA TCTTCAATGG AGATGGGATA TCTACAAAACG
 2521 ACTCTCTTTA CGATTGTATT CTCTCTGATG AAAAAAATC GTGTAATACA TCAATGGCCG
 2581 TATGTCATC AACATATCTT CCAATCCCC TAAGTGACTT TATTATGCCG GTTAGGCAGA
 2641 TATTTTCTGG AATCCTAAAT CATTAAATCCA TTACTAAAT AAATAAACAA TACCGTTTAG
 2701 GTAATTAAAC ATGATTCTAG TGTTTATTGT CGTATGTACG GGCGATGGGT GGATAACAAAC
 2761 TCGACAATGA TCAATTATAT TGATTAACCT TGTAAATAAAT TCGTCGGATT ATGGATATA
 2821 TCGAGATGAT ATCACAATTAT TTTCTAATAG CGTGTGTTTG AAAGTCCACC CTACTAGTGC
 2881 CATGTGCGCG TTTGATCGAA GAGGCATTTA ATGTTGCCAG AGTTTCAATT CCGTATGTAT
 2941 CGTCGAGTAA TCTAGA

FIG. 2 suite

4 / 4

FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/39 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 786 518 A (THE PROVOST FELLOWS AND SCHOLARS OF THE COLLEGE OF THE HOLY AND UNDIVI) 30 July 1997 (1997-07-30) the whole document	1-6
A	WO 98 03198 A (MERIAL) 29 January 1998 (1998-01-29) the whole document	1-20
A	WO 97 49825 A (MERIAL) 31 December 1997 (1997-12-31) the whole document	1-20
A	EP 0 532 833 A (MILES) 24 March 1993 (1993-03-24) cited in the application the whole document	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 1999

Date of mailing of the international search report

22/07/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo rd,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 99/00453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 786518 A	30-07-1997	AU 703942 B AU 1234697 A BR 9700768 A CA 2195935 A CZ 9700214 A JP 9215492 A NZ 314091 A PL 318095 A US 5895654 A	01-04-1999 07-08-1997 03-11-1998 26-07-1997 18-03-1998 19-08-1997 26-06-1998 04-08-1997 20-04-1999
WO 9803198 A	29-01-1998	FR 2751226 A AU 3772797 A	23-01-1998 10-02-1998
WO 9749825 A	31-12-1997	FR 2750865 A AU 3447497 A CA 2258735 A EP 0910657 A	16-01-1998 14-01-1998 31-12-1997 28-04-1999
EP 532833 A	24-03-1993	JP 5155782 A	22-06-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Office International No

PCT/FR 99/00453

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/39 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 786 518 A (THE PROVOST FELLOWS AND SCHOLARS OF THE COLLEGE OF THE HOLY AND UNDIVI) 30 juillet 1997 (1997-07-30) le document en entier ---	1-6
A	WO 98 03198 A (MERIAL) 29 janvier 1998 (1998-01-29) le document en entier ---	1-20
A	WO 97 49825 A (MERIAL) 31 décembre 1997 (1997-12-31) le document en entier ---	1-20
A	EP 0 532 833 A (MILES) 24 mars 1993 (1993-03-24) cité dans la demande le document en entier -----	1-20

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juillet 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date internationale No

PCT/FR 99/00453

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 786518 A	30-07-1997	AU 703942 B	01-04-1999
		AU 1234697 A	07-08-1997
		BR 9700768 A	03-11-1998
		CA 2195935 A	26-07-1997
		CZ 9700214 A	18-03-1998
		JP 9215492 A	19-08-1997
		NZ 314091 A	26-06-1998
		PL 318095 A	04-08-1997
		US 5895654 A	20-04-1999
WO 9803198 A	29-01-1998	FR 2751226 A	23-01-1998
		AU 3772797 A	10-02-1998
WO 9749825 A	31-12-1997	FR 2750865 A	16-01-1998
		AU 3447497 A	14-01-1998
		CA 2258735 A	31-12-1997
		EP 0910657 A	28-04-1999
EP 532833 A	24-03-1993	JP 5155782 A	22-06-1993